



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 101 26 472 A 1**

⑤ Int. Cl.⁷:
A 61 K 31/711
A 61 K 48/00
C 12 Q 1/68

⑲ Aktenzeichen: 101 26 472.0
⑳ Anmeldetag: 31. 5. 2001
㉑ Offenlegungstag: 5. 12. 2002

DE 101 26 472 A 1

⑦① Anmelder:
Max-Delbrück-Centrum für molekulare Medizin,
13125 Berlin, DE

⑦④ Vertreter:
Baumbach, F., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
13125 Berlin

⑦② Erfinder:
Brett, Dave, Dr., 13187 Berlin, DE; Kemmner,
Wolfgang, Dr., 13469 Berlin, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

- ⑤④ Verwendung des Nachweises der Expression von Splice-Varianten von Gen21 für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen
- ⑤⑦ Die Erfindung betrifft die Verwendung von Splice-Varianten der Sequenz Gen21 für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen. Die mRNA-Expression einer Splice-Variante der Sequenz Gen21 ist in kolorektalen Karzinomen später Stadien reduziert oder nicht vorhanden. Untersuchungen an 100 gut dokumentierten Fällen kolorektaler Karzinome zeigen, daß die Expression der Splice-Variante der Sequenz Gen21 einen prognostischen Faktor für das Überleben solcher Patienten darstellt. Die Aktivierung der Expression dieser Sequenz durch pharmazeutische Mittel ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

DE 101 26 472 A 1

Beschreibung

[0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung von Splice-Varianten der Sequenz Gen21 für die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen. Anwendungsgebiete sind die Medizin und die pharmazeutische Industrie.

[0002] In Arbeiten der Arbeitsgruppe von John D. Minna wurde durch somatisches genetisches Mapping von Tumorzelllinien, Tumorbiosien und von präinvasiven Läsionen aus humanen Lungen- und Brustgewebeproben ein Bereich auf Chromosom 3p21.3 entdeckt, der möglicherweise Tumorsuppressorgene enthält (1). In diesem Bereich, der etwa 630 Kilobasen umfaßt, wurden 25 Gene gefunden. Vier dieser Gene zeigten eine verringerte mRNA-Expression in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen. In 6 dieser Gene, darunter in Gen21, wurden Mutationen gefunden, die zur Bildung einer veränderten Aminosäuresequenz führten. Allerdings trat keine dieser Mutationen in mehr als 10% der getesteten Lungenkarzinome auf, und es ist nichts über die prognostische Bedeutung dieser Gene bekannt. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das postulierte Tumorsuppressorgen bisher nicht nachgewiesen werden konnte, und daß vor allem die Sequenz Gen21 nicht als Tumorsuppressorgen identifiziert wurde. Darüber hinaus wurden bisher keine Daten über ein Vorkommen oder eine Funktion von Gen21 in kolorektalen oder anderen Karzinomen publiziert.

[0003] Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, neue Tumorsuppressorgene auf Chromosom 3p21.3 zu finden, die für die Diagnose und die Therapie von Tumorerkrankungen geeignet sind.

[0004] Überraschend wurde gefunden, daß in kolorektalem Gewebe zumindest 2 Splicevarianten von Gen21 auftreten, die als Gen217 und Gen215 bezeichnet werden. Dabei handelt es sich bei Gene215 um eine Splicevariante von Gen217, der zwei Sequenzabschnitte fehlen. Die mRNA-Sequenz von Gen215 ist daher kürzer als die von Gen217. Dies gilt allerdings nicht für die Proteinsequenz. Da die RNA-Sequenz von Gen217 ein Stop-Kodon enthält, ist die kodierte Peptidsequenz von Gen217 gegenüber der von Gen215 verkürzt.

[0005] Die Gensequenzen von Gen215 und Gen217 sind in den Abb. 2 und 3 dargestellt.

[0006] In Untersuchungen von kolorektalem Gewebe, die mit der Microarray-Technologie von Affymetrix (GeneChip) durchgeführt wurden, zeigte sich, daß die Expression von Gen215 in gesundem Kolongewebe 5-mal höher ist als in Karzinomgewebe. Untersuchungen von kolorektalen Karzinomen von 102 Patienten mit quantitativer RT-PCR (One-step multiplex Taqman-PCR) ergaben, daß Gen215 in etwa 40% der Fälle nicht exprimiert wurde. Statistische Auswertungen zeigten einen deutlichen Einfluß der Expression von Gen215 auf das Überleben der Patienten (log rank, $p = 0,04$).

[0007] Erfindungsgemäß wird deshalb mit Gen215 eine Substanz bereitgestellt, die zu prognostischen, diagnostischen und therapeutischen Zwecken bei Tumorerkrankungen verwendet werden kann. Die Expression von Gen215 stellt einen prognostischen Faktor zur Diagnose von Tumorerkrankungen dar. Gegenstand der Erfindung ist deshalb der Einsatz von Gen215 für die Prognose, wobei die Konzentration des Gen215 Proteins und/oder die Expression ihrer sie kodierenden Gene bestimmt wird, z. B. durch Bestimmung der mRNA Expression mittels RT-PCR oder Expressionsbestimmung mit Hilfe von Microarrays durch Immobilisierung einer entsprechenden Oligonukleotidsequenz.

[0008] Durch Messungen der Expression von Gen215 in Tumorgewebe aus Resektaten oder Biopsien von Patienten können Prognosen für das Überleben (die Lebenserwartung

z. B. nach Operationen oder chemotherapeutischen Behandlungen) eines Patienten gemacht werden. Wird Gen215 normal exprimiert, leben nach 60 Monaten noch etwa 80% der Patienten. Wird Gen215 nicht exprimiert, leben nach 60 Monaten nur noch 40% der Patienten (unveröffentlicht).

[0009] Gegenstand der Erfindung sind ferner therapeutische Mittel zur Behandlung von Tumorerkrankungen, welche Substanzen enthalten, die die Expression von Genen, die Gen215 oder Gen217 kodieren, aktivieren. Diese therapeutischen Substanzen werden in die jeweiligen Tumorzellen appliziert. Bevorzugt liegen die therapeutischen Mittel in Formulierungen zur parenteralen Applikation oder zur gentherapeutischen Anwendung vor.

[0010] Die Erfindung soll nachfolgend durch Ausführungsbeispiele näher erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Nutzung des Expression von Gen215 als Prognosemarker

[0011] Es wird die Gen215 Expression in Biopsien durch RT-PCR Methoden oder durch Immobilisierung der entsprechenden Oligonukleotidsequenz auf einem Microarray (z. B. Genchip der Firma Affymetrix oder andere Microarrays) gemessen.

[0012] Die RT-PCR wird wie folgt durchgeführt. Karzinomgewebe wird in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines Gewebs-Homogenisators aufgelöst. RNA wird extrahiert mit Hilfe der GTC Methode. Zur Quantifizierung der Expression wird die Taqman-Methode RT-PCR von Applied Systems PE benutzt. Als Referenz dient die Expression des Housekeeping-Gens beta-Aktin. Dazu wird beta-Aktin im selben Reaktionsgefäß ko-amplifiziert. Beta-Aktin wird mit folgenden Primern amplifiziert und mit der Sonde nachgewiesen:

Vorwärtsprimer: TCA GCA AGC AGG AGT ATG ACG A
Rückwärtsprimer: CGC AAC TAA GTC ATA GTC CGC C
Sonde: TET-CCA TCG TCC ACC GCA AAT GCT TC-TAMRA

Die Länge des Reaktionsprodukts beträgt 80 Basenpaare.

[0013] Das Gen215 wird mit folgenden Primern amplifiziert und mit der Sonde nachgewiesen:

Vorwärtsprimer: AACGGAGGAAGCTGATCCA
Rückwärtsprimer: CTCATGCTGTCTTGCAGCA

Gen215 IV Sonde: FAM-ATCCTGTGCGGGT-GACTCGGGA-TAMRA

Die Länge des Reaktionsprodukts beträgt 156 Basenpaare.

[0014] Für die Reaktion wird der Applied Systems PE Universal Master Mix 430 4437 benutzt.

[0015] In Abb. 1 ist das Überleben von Patienten mit oder ohne Expression von Gen215 im Gewebe dargestellt. Die Überlebenskurve wurde nach Kaplan-Meier erhalten und die Signifikanz der Differenzen wurde mit dem log-rank Test berechnet. Die Expression von Gen215 war hoch assoziiert (log rank, $p = 0,04$) mit dem Überleben der Patienten (X-Achse: Überlebenszeit nach der Operation in Monaten; Y-Achse: Wahrscheinlichkeit des Überlebens).

Literatur

- (1) Michael I. Lerman and John D. Minna: The 630-kb Lung Cancer Homozygous Deletion Region on Human Chromosome 3p21.3: Identification and Evaluation of the Resident Candidate Tumor Suppressor Genes. Cancer Res 60, 6116-6133, 2000;
- (2) Brett D. Kimmner W, Koch G, Roefzaad C, Gross S, Schlag PM. A rapid bioinformatic method identifies novel genes with direct clinical relevance to colon cancer. Onco-

gene, 2001, in press.

Patentansprüche

1. Verwendung von Splice-Varianten von Gen21 für 5
die Diagnose und Therapie von Tumorerkrankungen.
2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekenn-
zeichnet, daß die Varianten Gen215 oder Gen217 be-
nutzt werden.
3. Verwendung nach Anspruch 1 und 2, dadurch ge- 10
kennzeichnet, daß die Konzentration des Gen215 bzw.
des Gen217 Proteins und/oder die Expressionrate der
kodierenden Gene Gen215 und Gen217 in den Tumorzellen bestimmt wird.
4. Verwendung nach Anspruch 1 bis 3, dadurch ge- 15
kennzeichnet, daß die m-RNA Expression der Splice-
Varianten von Gen21 bestimmt wird.
5. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die Expressionsbestimmung mit
Hilfe von RT-PCR erfolgt. 20
6. Verwendung nach Anspruch 1 bis 5, dadurch ge-
kennzeichnet, daß die Expressionsbestimmung mit
Hilfe von Mikroarrays nach Immobilisierung der ent-
sprechenden Oligonukleotidsequenz erfolgt.
7. Sequenz von Gen215 nach **Abb. 2.** 25
8. Sequenz von Gen217 nach **Abb. 3.**
9. Therapeutische Mittel zur Behandlung von Tumorerkrankungen, dadurch gekennzeichnet, dass sie Substanzen enthalten, die die Expression von Genen, die Splice-Varianten von Gen215 kodieren, aktivieren. 30
10. Therapeutische Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß Expression der Gene Gen215 oder Gen217 aktiviert wird.
11. Therapeutische Mittel nach Anspruch 9 und 10, 35
dadurch gekennzeichnet, daß sie als Formulierungen
zur parenteralen Applikation oder zur gentherapeutischen Anwendung vorliegen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -

Gene215 und Überleben der Patienten

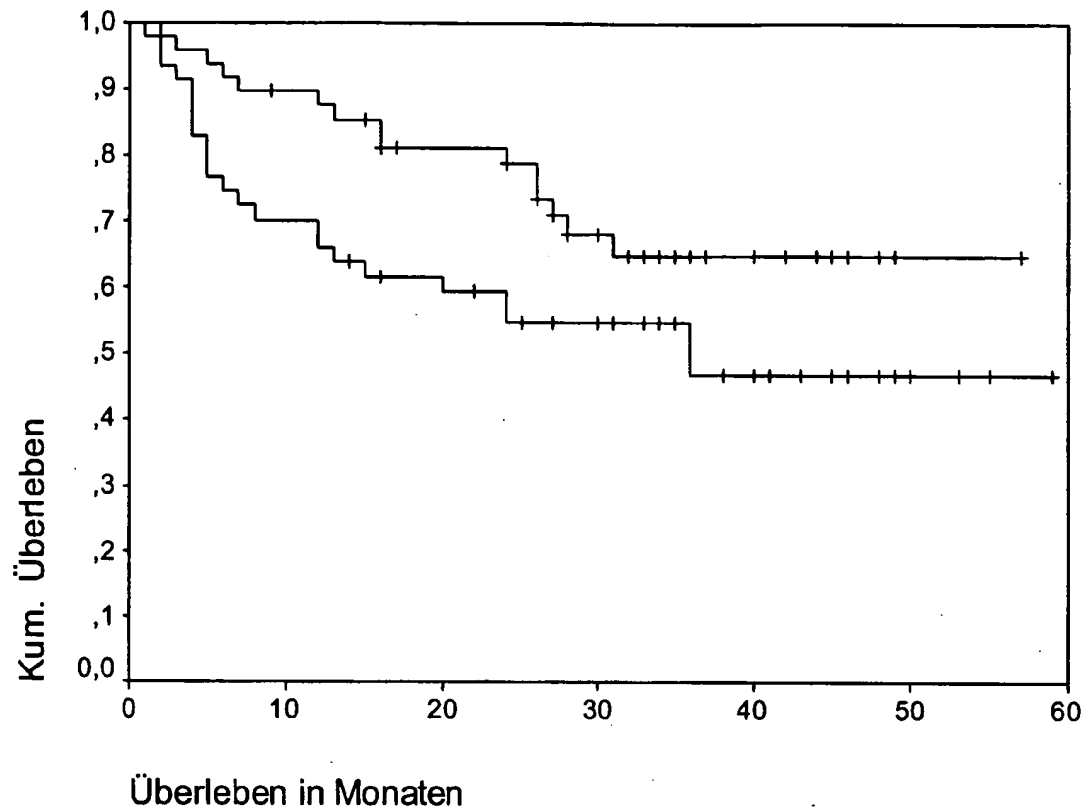


Abbildung 1

Abbildung 2: Gen215:

gagcctctg	cgcgaggaac	gaggagctac	gggcctgggc	ccggttattg	ccatgggcag
cggtgccgc	atcgaatgca	tattcttcag	cgagttccac	cccacgctgg	gacccaagat
cacctatcag	gtccctgaag	acttcatctc	ccgagagctg	tttgacacag	tccaagtgtg
catcatcacc	aagccagagc	tgcagaacaa	gcttatcact	gtctagagag	cagcttcgtg
tccatggagg	agagcaagca	gaagttggtg	cccacatga	ccatcttgct	ggaggagcta
aatgcctcag	gccggtgcac	tctgcccatt	gatgagtcca	acaccatcca	cttgaagggtg
attgagcagc	ggccagaccc	tccggtggcc	caggagtatg	atgtacctgt	ctttaccaa
gacaaggagg	atttcttcaa	ctcacagtgg	gacctcacta	cacaacaaat	cctgccctac
attgatgggt	tccgccacat	ccagaagatt	tcagcagagg	cagatgtgga	gctcaacctg
gtgcgcattg	ctatccagaa	cctgctgtac	tacggcgttg	tgacactggt	gtccatcctc
cagtactcca	atgtatactg	cccaacgccc	aagggtccagg	acctggtaga	tgacaagtcc
ctgcaagagg	catgtctatc	ctacgtgacc	aagcaagggc	acaagagggc	cagtctccgg
gatgtgttcc	agctatactg	cagcctgagc	cctggcacta	ccgtgcgaga	cctcattggc
cgccaccccc	agcagctgca	gcatgttgat	gaacggaagc	tgatccagtt	cgggcttatg
aagaacctca	tcaggcgact	acagaagtat	cctgtgcggg	tgactcgga	agagcagagc
caccctgccc	ggctttatac	aggctgccac	agctatgacg	agatctgctg	caagacaggc
atgagctacc	atgagctgga	tgagcggctt	gaaaatgacc	ccaacatcat	catctgctgg
aagttaggct	ggtagtact	ggatggacac	attgctgtgg	gtagtccctc	ctactaggag
gcttgctata	ctgtctagag	gttgactctt	agttctgtaa	ataaagacat	ccatttcaaa
caaaaaaaaa					

Abbildung 3: Gen217:

gaattcgcca	cgaggcctct	gcgcgaggaa	cgaggagcta	cgggcctggg	cccggttatt
gccatgggca	gcggctgccg	catcgaatgc	atattcttca	gcgagttcca	ccccacgctg
ggacccaaga	tcacctatca	ggtccctgaa	gacttcatct	cccgagagct	gtttgacaca
gtccaagtgt	acatcatcac	caagccagag	ctgcagaaca	agcttatcac	tgtcacagct
atggaaaaga	agctgatcgg	ctgtcctgtg	tgcatcgaac	acaagaagta	cagccgcaat
gctctcctct	tcaacctggg	cttcgtgtgt	gatgcccagg	ccaagacctg	cgccctcgag
cccattgtta	aaaagctggc	tggctatctg	accacactag	agctagagag	cagcttcgtg
tccatggagg	agagcaagca	gaagttggtg	cccacatga	ccatcttgct	ggaggagcta
aatgcctcag	gccggtgcac	tctgcccatt	gatgagtcca	acaccatcca	cttgaagggtg
attgagcagc	ggccagaccc	tccggtggcc	caggagtatg	atgtacctgt	ctttaccaa
gacaaggagg	atttcttcaa	ctcacagtgg	gacctcacta	cacaacaaat	cctgccctac
attgatgggt	tccgccacat	ccagaagatt	tcagcagagg	cagatgtgga	gctcaacctg
gtgcgcattg	ctatccagaa	cctgctgtac	tacggcgttg	tgacactggt	gtccatcctc
cagtactcca	atgtatactg	cccaacgccc	aagggtccagg	acctggtaga	tgacaagtcc
ctgcaagagg	catgtctatc	ctacgtgacc	aagcaagggc	acaagagggc	cagtctccgg
gatgtgttcc	agctatactg	cagcctgagc	cctggcacta	ccgtgcgaga	cctcattggc
cgccaccccc	agcagctgca	gcatgttgat	gaacggtcag	aggagaattt	gctggggcat
ttgggagtta	cctgagggaa	gctagacctt	ttatgtctct	caggagccct	ggatcatggg
gcactgccaa	tccaagcagg	cttcctggag	atgatgggct	acagagacaa	aattgaaggg
agactacagg	aaagggttgg	cctgcctgaa	agaaggcctg	gccagggcgt	caccccgctc
tctgatccctc	accctaggaa	gctgatccag	ttcgggctta	tgaagaacct	catcaggcga
ctacagaagt	atcctgtgcg	ggtgactcgg	gaagagcaga	gccaccctgc	ccggctttat
acaggctgcc	acagctatga	cgagatctgc	tgcaagacag	gcatgagcta	ccatgagctg
gatgagcggc	ttgaaaatga	ccccaacatc	atcatctgct	ggaagtgagg	ctggtagtga
ctggatggac	acattgctgt	gggtagtccc	tctactagg	aggcttgtca	tactgtctag
aggttgactc	ttagttctgt	aaataaagac	atccatttca	aacaaaaaaa	